

CELL CULTURE UNIT

Publication number: JP62118878 (A)

Publication date: 1987-05-30

Inventor(s): MATSUDA YOSHIKI; MITSUDA SHINJIRO +

Applicant(s): SNOW BRAND MILK PROD CO LTD +

Classification:

- international: C12M3/00; C12M3/04; C12M3/00; C12M3/04; (IPC1-7): C12M3/00

- European:

Application number: JP19850258269 19851118

Priority number(s): JP19850258269 19851118

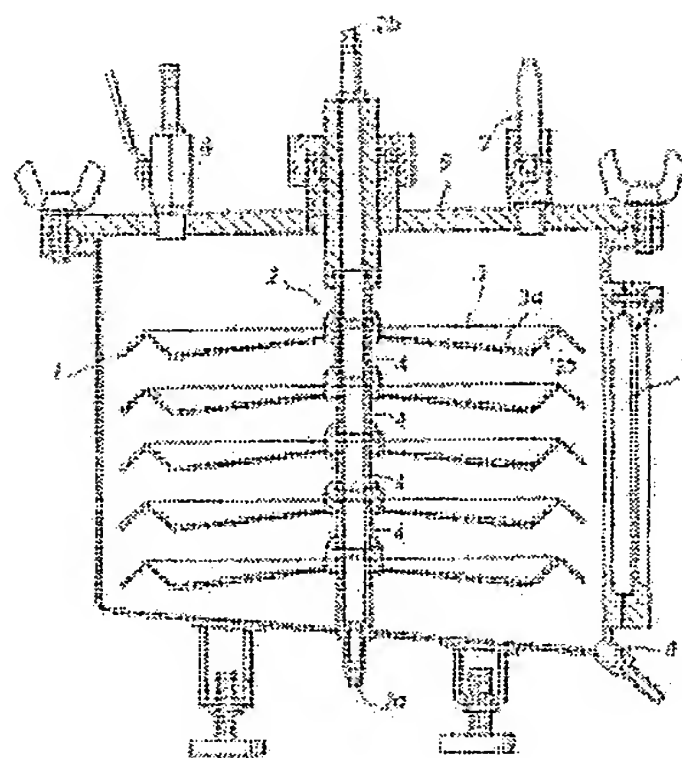
Also published as:

JP5085156 (B)

JP1873015 (C)

Abstract of JP 62118878 (A)

PURPOSE: Cultivation dishes of a specific shape is set in a culture tank in multiple stages with a certain interval and each dish is equipped with a sintered metal filter at its center to supply the culture medium therefrom whereby mass cultivation of adhesive cells is possible. **CONSTITUTION:** Cultivation dishes 3 which have the bottom 3a inclining toward the periphery and the cross section of reversed V-shape at the periphery, are set in multistages in the tank 1. Individual dishes 3 is equipped with a sintered metal filter 4 at the center to feed the culture medium therefrom. Further, an overflow outlet 8 is formed at the bottom of the tank. In other words, the medium is fed from inlet 2a, passed through filters into each dish. The medium whose nutrients have been consumed by proliferation of the cells is allowed to overflow from the periphery of the dishes for recovery. The recovered medium can be utilized again, by mixing with waste or the make-up medium. Thus, mass cultivation of adhesive cells becomes possible.



Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-118878

⑬ Int. Cl.⁴
C 12 M 3/00

識別記号

庁内整理番号
8114-4B

⑭ 公開 昭和62年(1987)5月30日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 細胞培養装置

⑯ 特 願 昭60-258269

⑰ 出 願 昭60(1985)11月18日

⑱ 発 明 者 松 田 義 章 栃木県下都賀郡石橋町下古山231
⑲ 発 明 者 満 田 伸 二 郎 宇都宮市雀の宮7-3-11
⑳ 出 願 人 雪印乳業株式会社 札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 渡 辺 勤

明 細 書

1 発明の名称

細胞培養装置

2 特許請求の範囲

底面が外周に向かって下向きに傾斜し、かつ外周に断面山形の立縁を形成した培養皿を一定の間隔を隔てて培養槽内に多段に設け、かつ各培養皿の中央部分には焼結金属フィルターを設けてここから培地が供給されるように構成し、更に培養槽底面にはオーバーフロー培地出口を設けたことを特徴とする細胞培養装置。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は動物細胞(接着性細胞)を培養皿上に特殊な方法により増殖させ、連続的に生理活性物質を産生させる細胞培養装置に関するものである。

(従来技術)

従来接着性細胞の培養に当たっては大量培養装置として(A)細胞の接着面積を大きくする

ために容器内に多数の板を平行に設けたものがあり、そのうちの1つの型は液封方式ともいうべきもので板に細胞を付着させた後pH、DO(溶存酸素)を制御しながら培養液を循環させる形式、他の1つはレコード板のようなものを平行に円筒中に並べ、まず始めに垂直に立て(板は水平になる)細胞懸濁液を流し込み、細胞を板に接着させ、次いで横にして回転方式で培養する形式である。

以上のようなものの他(B)プラスチックフィルムを渦巻状にしたものを円筒におさめたもので細胞培養はローラー培養と同様に行い、次いで垂直に立て、空気等を送り込むことにより培養液を循環させる形式がある。

更に(C)重箱構造のもので(A)と異なる点は気相が存在することである。この方式は原理的にはルービンと同じで静置培養であり、培養液を循環させる必要はない。マルチトレイ方式と呼ばれるものである。

次は(D)酸素あるいは炭酸ガスの透過性の

プラスチックバッグを消防ホースのようにまき込んだスタイルのもので、DOやpH制御を容易にしている。培養液はホース内に通ずるプラスチックバッグ形式である。中空繊維（ホローファイバー）形式は（E）人工腎臓などで用いられている透析用の中空繊維の表面に細胞を接着、増殖させようとするもので栄養の供給を細胞層の裏側から行うことができる。

又、（F）容器に充填したガラスビーズ表面に細胞を接着、増殖させるものでpHやDOを調整した培養液を循環させるガラスビーズ充填カラム形式の他（G）ガラスビーズではなく20～40回転／分位のゆるい攪拌下で培養液に浮遊する程度の比重の微少ビーズ表面に細胞を培養、増殖させるもの、すなわちマイクロキャリア方式がある。しかしながら、これは剪断力のダメージを受け易く、かつコロニー形成率の低い細胞にとって、マイクロキャリア培養は非常に困難である。

（発明が解決しようとする問題点）

ルターを設けてここから培地が供給されるように構成し、更に培養槽底面にはオーバーフロー培地出口を設けたものである。

（発明の効果）

この技術的手段によれば培地供給口から培地を各培養皿に設けて焼結金属フィルターを介して供給するもので、細胞の増殖によって培地成分を消費した培地は山状になっている培養皿の周囲からオーバーフローして回収される。回収された培地は廃液又は新鮮培地と混合することにより再利用できるし、培養皿の底面は勾配があり、培地が供給されると培養皿にたまっていた培地は中心部より押し出され、山状の立縁からオーバーフローするけれども皿の周囲は山状となっているのでオーバーフローした培地は周囲に飛散し、下段の皿に混入しない。

したがって本発明のものは連続培養が可能であり、また細胞は攪拌されることなく、培地は培体上に増殖した細胞の間を焼結金属フィルターを介して、放射状に滲出、循環されるためマ

以上述べたようにそれぞれ特徴をもったいろいろな装置あるいは方法が接着性細胞の大量培養化のために考案されているが実用的な細胞生産物の量産システムとしてはまだあまり用いられていなく試験用段階で終わってしまったものが多い。

現在でもこの種の細胞の大量培養をしてインターフェロンやワクチンの量産などのためにまだローラービン方式が使用されているという手工業的なレベルに近い状況にある。

（問題点を解決するための手段）

したがって本発明の技術的課題は接着性細胞の大量培養のできる実用的な細胞培養装置を提供することを目的とするものでこの技術的課題を解決する本発明の技術的手段は多段式トレー培養システムを採用するものである。

すなわち、底面が外周に向かって下向きに傾斜し、かつ外周に断面山形の立縁を形成した培養皿を一定の間隔を隔てて培養槽内に多段に設け、かつ各培養皿の中央部分には焼結金属フィ

マイクロキャリア法と比較して細胞の剪断力によるダメージは極めて小さく、細胞増殖を最適条件で行える。

しかして、培養皿の液深は小さく、またヘッドスペースも大きくとれることから、ガス移動は行われ易く、またマルチトレー方式とは異なって全てのステップを自動化することが可能である。又、高密度培養が可能であり、蒸気滅菌の可能な培体の利用により、一連の生産プロセスをインラインで蒸気滅菌でき、それにより汚染の危険性は極めて少ないものとなる。

（実施例）

以下図面に示す実施例について説明する。
第1図において（1）は培養槽であり、（2）は培養槽（1）の中央に立設された中心軸筒であり、（3）はこれに一定間隔へだてて取付けられた培養皿である。

培養皿は底面（3a）が外周に向かって下向きに傾斜し、かつ外周に断面山形の立縁（3b）が形成されている。この培養皿（3）に面する中

心軸筒(2)の開口部(2d)には焼結金属フィルター(4)がある。

(2a)は中心軸筒(2)の培地入口であり、(2b)は中心軸筒(2)の培地出口である。

(5)は培養槽(1)の蓋体でこれに気相入口(6)と気相出口(7)がある。(8)は培養槽(1)の底部に開口したオーバーフロー培地出口、(9)は培養槽(1)の視窓である。

以上のような培養槽(1)には培地供給口(2a)から培養皿(3)に設けた焼結金属フィルター(4)を介して培地を供給する。

細胞の増殖によって培地成分を消費した培地は山状になっている培養皿(3)の周囲を立縁(3b)からオーバーフローし、培地出口(8)から排出され回収される。回収された培地は廃液又は新鮮培地と混合することにより再利用される。

培養皿(3)の底面(3a)は下向きに傾斜しているので培地が供給されると培養皿(3)にたまっていた培地は中心部より前述した如く押

し出され立縁(3b)からオーバーフローする。立縁(3b)は山状となっているためオーバーフローした培地は周囲に飛散して下段の皿には混入することはない。

焼結金属フィルター(4)のポアサイズは $100\mu\text{m}$ で動物細胞の大きさは $10\sim 100\mu\text{m}$ であり、十分この焼結金属フィルターを通過することができる。又、金属イオンの溶出から細胞により増殖阻害を起こすので焼結金属フィルター、培養皿および装置は全て SUS316 製とする。一般に動物細胞装置は SUS316、SUS316L が使用される。

以上のような装置を用いての培養方法について述べると培養皿(3)には、細胞接着性のある

- ①微細な網状フィルターを張る。

- ②多孔性セラミックフラグメントを敷き詰める。

等の方法により S/V 値を大きくすることができる。因に S は表面積であり、 V は培地量である。すなわち、 S/V 値はマイクロキャリア

には劣るものの、マルチトレイ、プラスチックバッグ、スパイラルバッグ、ガラスビーズ等を大きく上回り、ホローファイバーに匹敵しうるものができる。

①については培養皿(3)の勾配部分と同じ大きさを有するフィルターを円盤状に張り、その上に同材質でできているフィルターをヒダ状に折り曲げ組み立てる。第2図の(10)はこれを示す。

このようにすることによりフィルター表面積は 7000cm^2 となる。特殊フィルターの表面積は見かけの表面積の約7倍あり、 10cm 四方の表面積は $10 \times 10 \times 7 = 700\text{cm}^2$ となる。

一枚のディスクで 7000cm^2 あるのでこれは通常用いられているローラーボトル (850cm^2) の8本分に相当する。つまり本装置は5段あるので $35,000\text{cm}^2$ (ローラーボトル41本分) となる。

②についても多孔性セラミックフラグメントを敷き詰めたことにより相当量の表面積となる。

以下に本装置の、他の装置と比較した場合の

優位性について述べる。

動物細胞ことに接着性細胞の培養装置として、種々のものが考案、また一部は実用化されている現状にある。中でも、微少のビーズ ($100\sim 200\mu\text{m}$) への細胞の接着を利用したマイクロキャリア用培養装置は、トンクラスのものが実用化されている。

しかしながら、切断力のダメージを受けやすく、かつコロニー形成率の低い細胞にとって、マイクロキャリア培養は非常に困難である。切断力による影響を低減化するためには、静置法のように細胞自身は接着表面に固定され、かつ培地交換が効率的に行えるシステムが望ましい。

その意味において、ガラス平板を多段にしたマルチトレイ法や中空繊維に細胞を接着させるホローファイバー法が実用化されている。マルチトレイ法はコンパクトで簡便な方法であるが、細胞接種、培地交換、生産物回収等を手作業で行う部分が多く、商業的生産には不適である。また、ホローファイバー法は培地容積当たりの

接着表面積、すなわち S/V 値が高く、高密度培養の可能なものであるが、現状ではホローファイバー自体高価であり、再使用も難しく、かつ蒸気滅菌が不可能であることから、商業生産する上で大きな障害となるものと思われる。

しかるに、本培養装置は上記方法の欠点を補うものである。すなわち、本装置では、細胞は各ディスク上の担体に接着、増殖し、その間を培地が循環し、かつ焼結金属フィルターより培地は放射上に滲出されるため、剪断力は極めて小さい。

また、マルチトレイ方式とは異なって、すべてのステップを自動化することが可能である。

トレイやディスクにかかわらず、多段システムに培地を循環供給する場合、各段に順次、培地を供給していくと、新鮮培地は入口に近い段でその栄養分の消費は進み、出口近くの段では逆に細胞自身の生産する乳酸、アンモニア等の生育阻害物質の濃度が高くなる。その結果、入口に近い段では良好な増殖はみられるものの、出

口に近い段において、増殖は阻害されることになる。

本装置では、培地は焼結金属フィルターを介して各段に均等に分配され、かつフィルターの細かな目を通して、放射上に移動するため、段間、また一つの段においても増殖の局在化はおこりにくい。

本装置を用いた各段への均一な培地の供給は、培地が滲出する金属フィルター部分の長さを調節することによっても可能ではあるが、各段への培地供給速度をより均等に制御するために第5図に示すような方法に改善することができる。本装置のディスク上に細胞の接着しうる担体、すなわちガラス、プラスチックフィルム、特に三次元構造をもつ多孔性セラミックフラグメント、繊維状フィルムを装填することにより S/V はマイクロキャリアには劣るものの、マルチトレイ、プラスチックバッグ、スパイラルフィルム、ガラスビーズカラム等を大きく上回り、ホローファイバーに匹敵しうるものとなる。

また、蒸気滅菌の可能な担体の利用により、一連の生産プロセスをインラインで蒸気滅菌でき、それにより汚染の危険性は極めて少ないものとなる。

さらに、本装置ディスク内の液深は小さく、またヘッドスペースも大きくとれることからガス移動は行われ易くなり、充填カラム式にみられる培地の酸素不足をふせぐことができる。又、フィルターの再利用は難しいがセラミックは酸、アルカリによる再生処理や蒸気滅菌が可能でありホローファイバーやマイクロキャリアと比較して安価に入手することができる。ホローファイバー、マイクロキャリアは酸、アルカリによる再生処理や蒸気滅菌が不可能で高価なものである。

第3、4図は変形実施例で培地は各培養皿(3)に対応して配置された培地供給管(11)から供給され、焼結金属フィルター(4)を介して各培養皿(3)に供給される。

培養槽(1)の底部にはオーバーフロー培地出

口(8)があり、各培養皿(3)における培地量を検出するためのセンサー用として更に又、サンプリング用としての孔(12)がある。

(13)(14)は蓋体に取り付けた安全弁と隔膜式圧力計を示す。又、(9)は覗窓である。

第1図に示すものによれば培地が下方から供給されるためヘッド圧によって各培養皿(3)に供給される培地の量が均一でなく、したがって各培養皿(3)において調整する必要があるが、第3図のものによれば各培養皿(3)個々に供給管(11)を介して供給されるのでその必要はない。

第5図のものは前述した如く培養皿への培地供給量を調節するもので、焼結金属フィルター(4)の開口度をリング(15)の遮蔽度によって調節する。リング(15)の取付具(15a)にはてこ杆(16)の一端が取付けられ、他端は蓋体(5)の懸吊杆(18)にピン止め(18a)されている。そして、てこ杆(16)の間は培養皿(3)の支持具(17)に支点(17a)止めさ

れている。

そこで懸吊杆 (18) のナット (19) の螺合度により懸吊杆 (18) は昇降し、これによって、てこ杆 (16) の一端 (18a) は昇降するのでてこ杆 (16) の他端は逆の昇降を行い、リング (15) を昇降させ焼結金属フィルター (4) の開口度を調節する。

てこ杆 (16) と取付具 (15a) との連結は次のようになっている。すなわち、てこ杆 (16) の内孔 (20) にスプリング (21) が介装され、このスプリング (21) で押圧されるスライド自在なピン (22) が取付具 (15a) にピン止めされている。したがってリング (15) はスプリング (21) によって緩衝される。

図示のものは中央軸筒 (2) に取付けられた培養皿 (3) のボス (3c) 上にリング (15) が位置している。

中央軸筒 (2) 内の焼結金属フィルター (4) はリング状をなし、中央軸筒 (2) の拡大径部 (2c) のスリット部 (2d) に臨んでいる。

したがってリング (15) 内部形状もこれに対応した形状となっている。

4 図面の簡単な説明

第1図は本発明培養装置の切断面図

第2図は特殊なフィルターをヒダ状にした使用する場合の斜面図

第3、4図は他の実施例にかかる本発明装置の切断面図と平面図

第5図は培地供給量調節装置を示す切断面図

第6、7図は焼結金属フィルター部分の切断面図と正面図

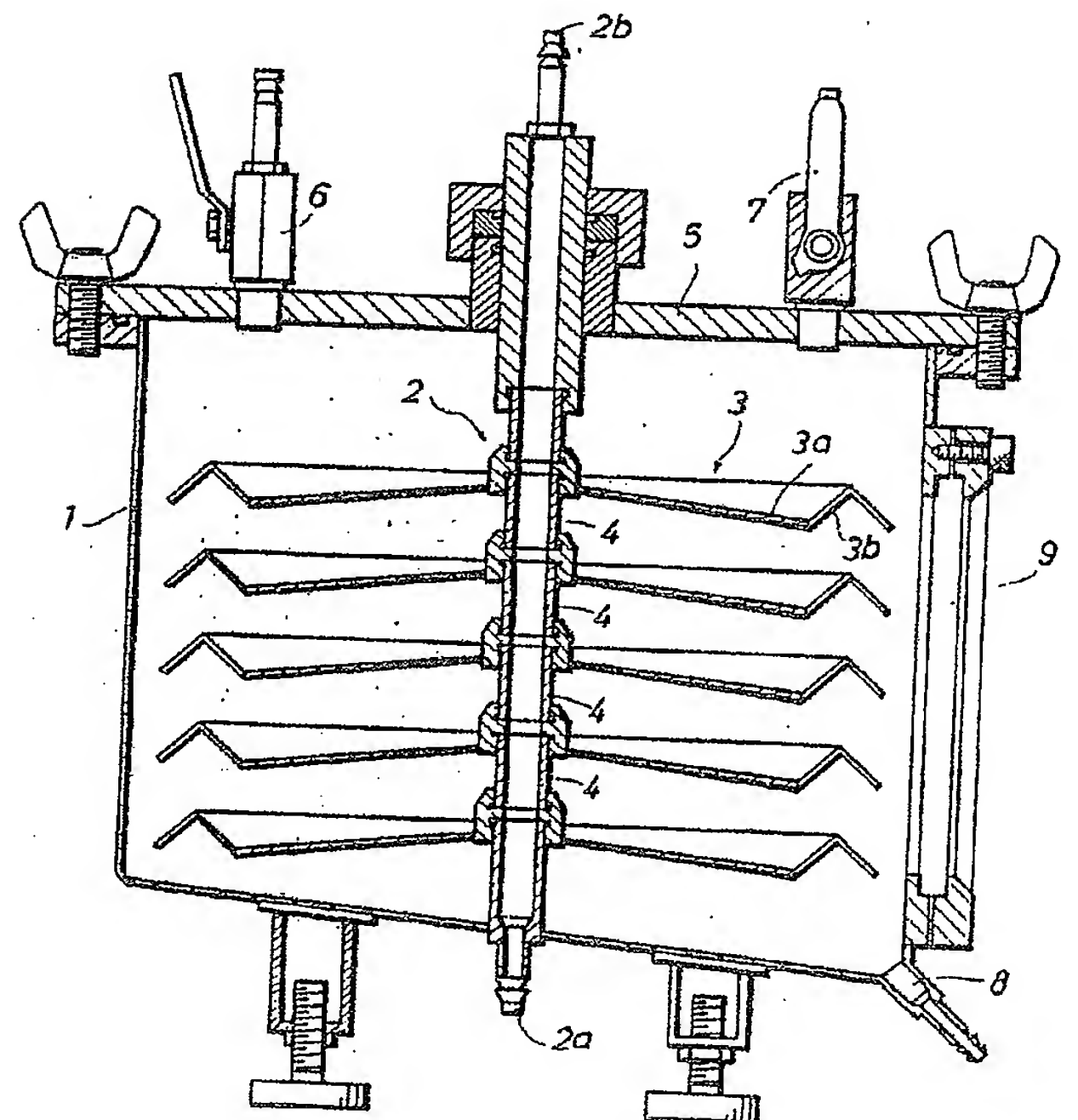
第8、9図はリングの切断面図と正面図

第10、11図は焼結金属フィルター部にリングを取付けた状態の切断面図と正面図である。

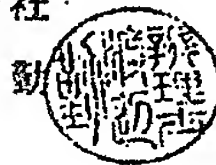
- (1) 培養槽
- (2) 中央軸筒
- (3) 培養皿
- (4) 焼結金属フィルター
- (5) 蓋体
- (6) (7) . 気相出入口

- (8) オーバーフロー培地出口
- (9) 視窓

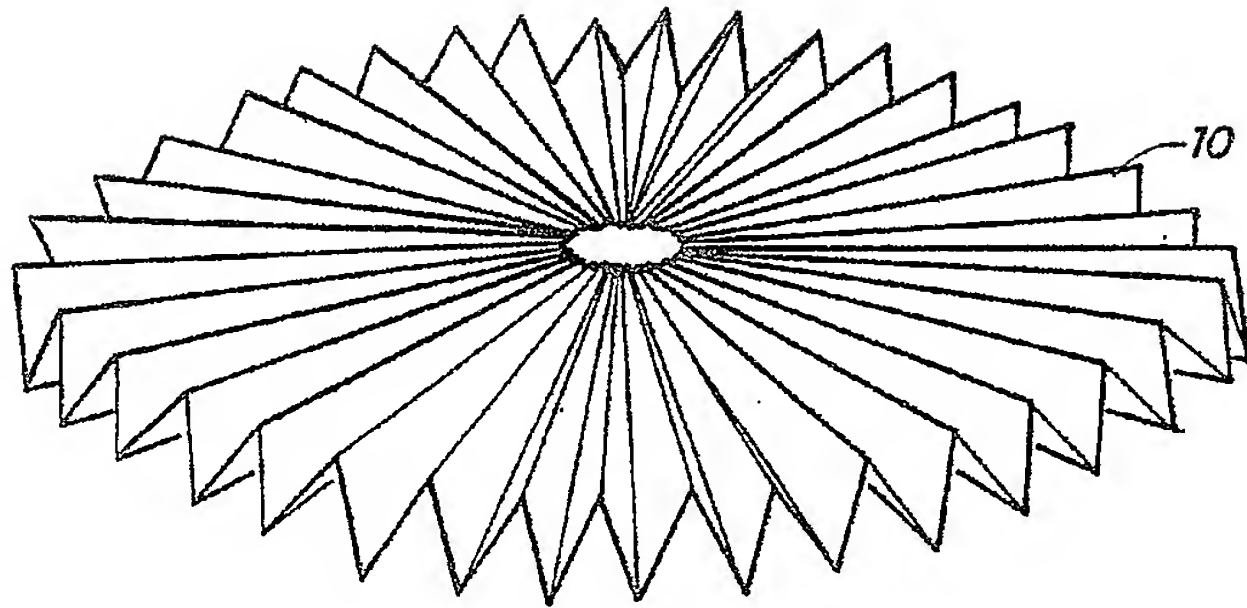
第 1 図



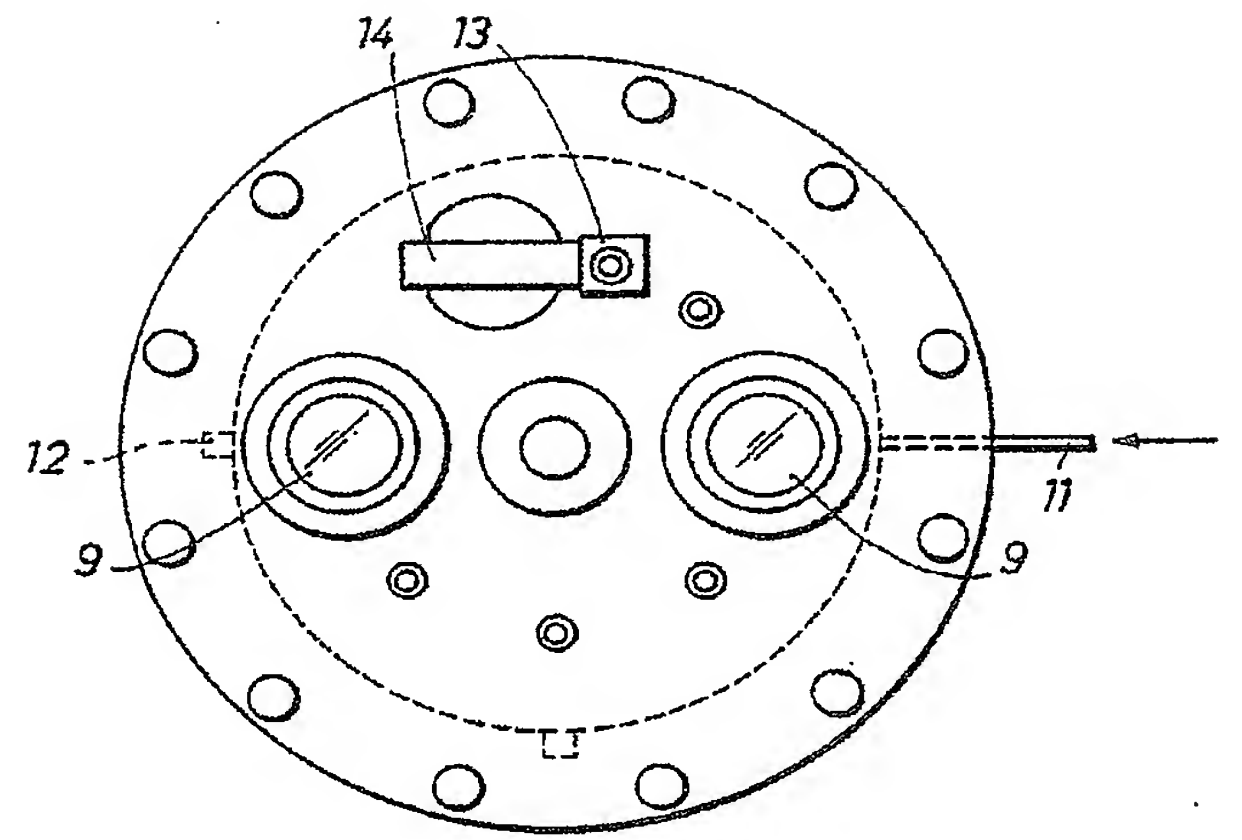
出願人 雪印乳業株式会社
代理人 渡 辺 勤



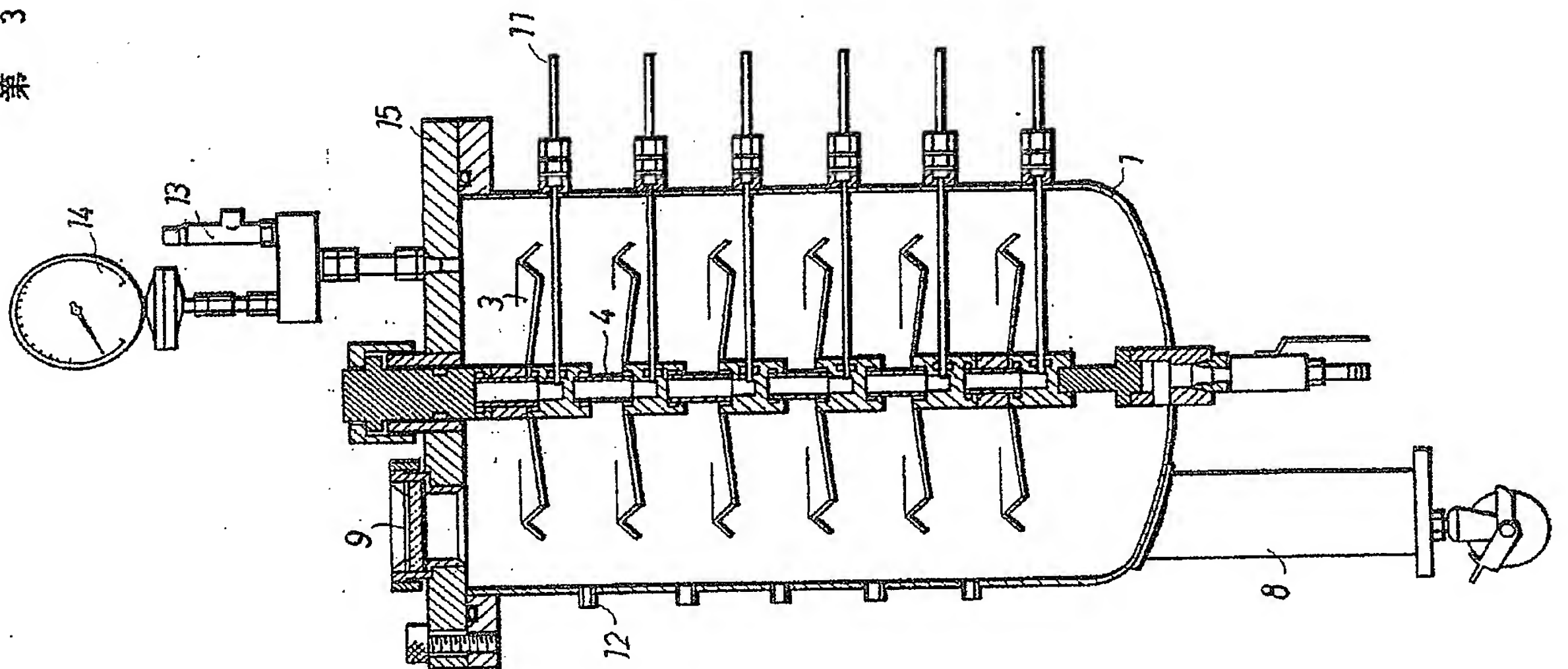
第 2 図



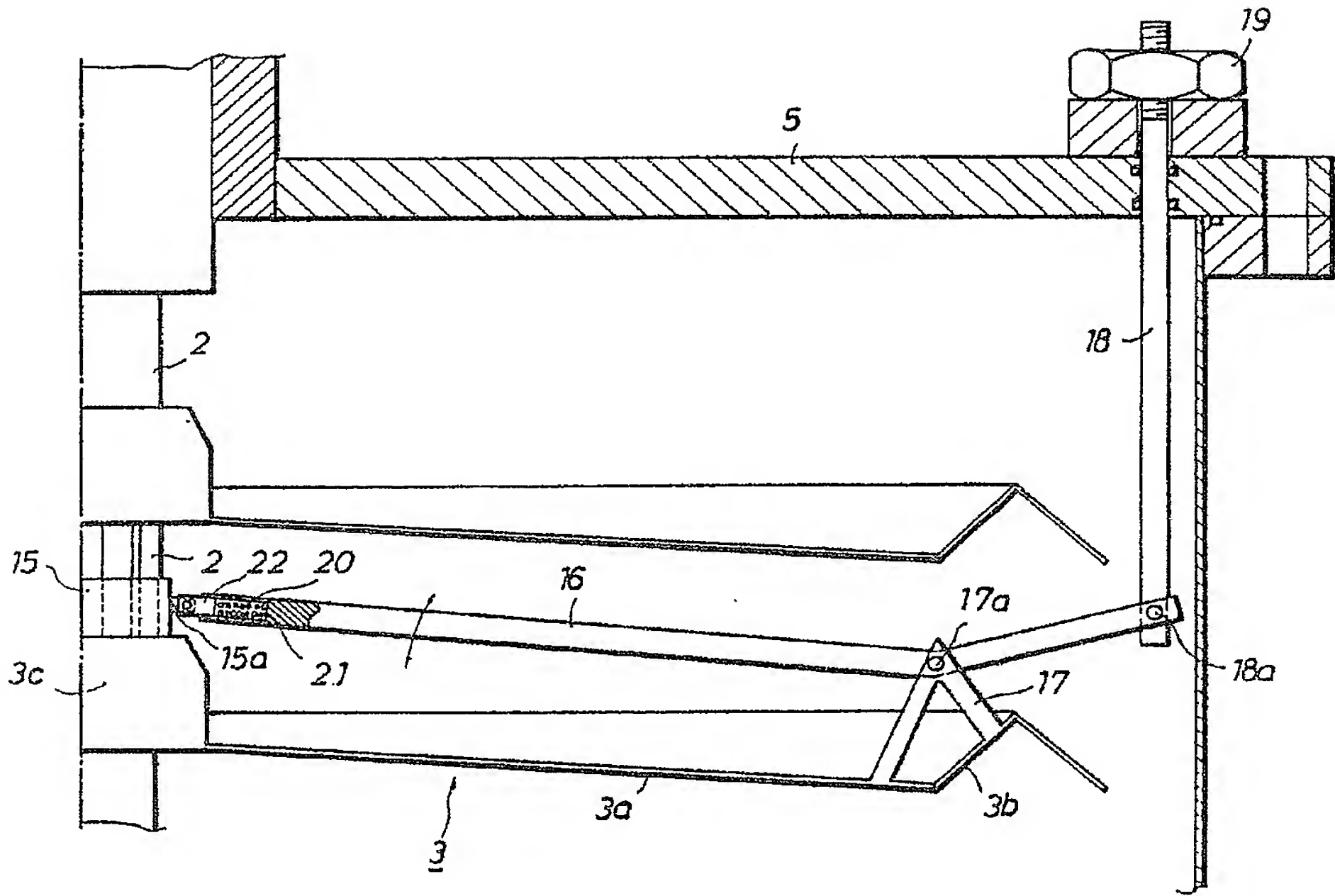
第 4 図



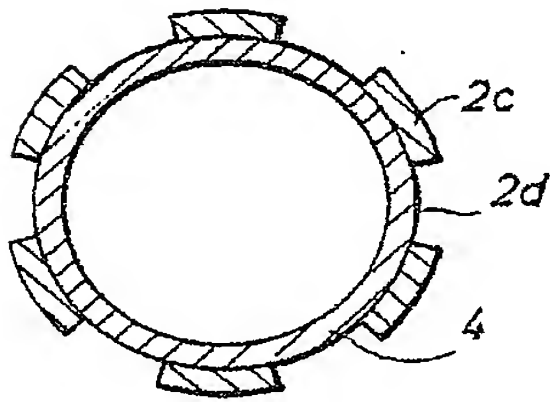
第 3 図



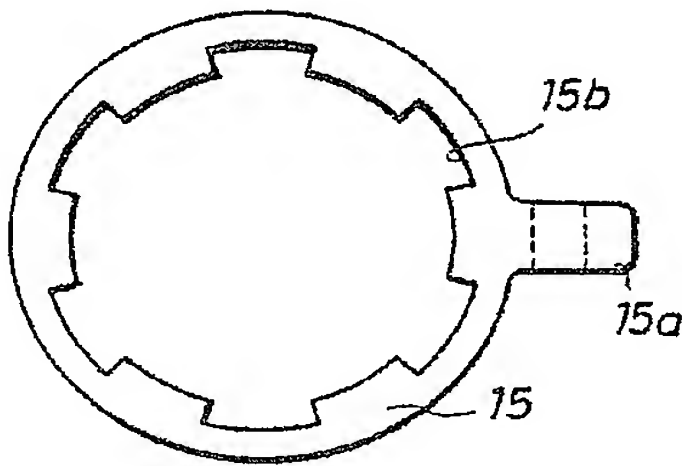
第 5 図



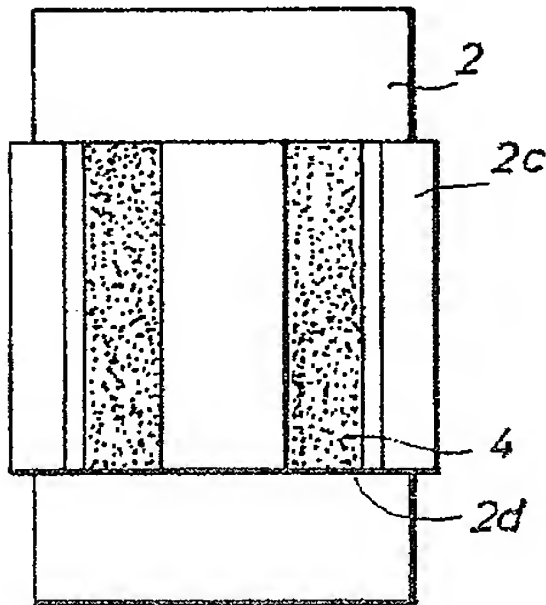
第 6 図



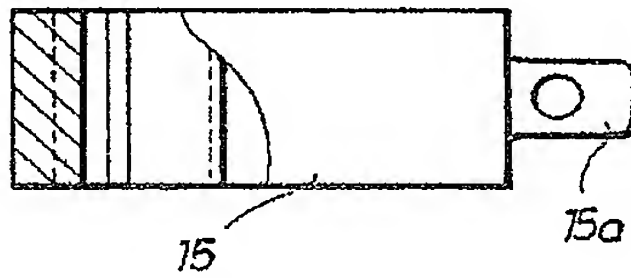
第 8 図



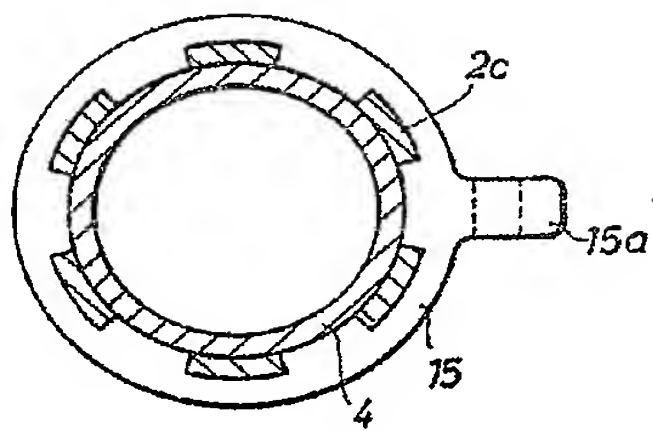
第 7 図



第 9 図



第 10 図



第 11 図

